



Il laboratorio di patologia molecolare diagnostica in anatomia patologica.

Raccomandazioni a cura del gruppo italiano di Patologia Molecolare e Medicina Predittiva (PMMP)

con il contributo di:

Massimo Barberis
Fiamma Buttitta
Michelangelo Fiorentino
Gabriella Fontanini
Antonio Marchetti
Aldo Scarpa
Giorgio Stanta
Giovanni Tallini
Giancarlo Troncone
Mauro Truini

Bologna, 30-31 Maggio 2016

Premessa

La diagnostica molecolare ha assunto un ruolo fondamentale nella caratterizzazione dei processi patologici, permettendo di effettuare una diagnosi più accurata e adeguata agli sviluppi clinici attuali. Ciò risulta utile per un corretto inquadramento del paziente ai fini della prognosi e del trattamento, in particolare con farmaci di nuova generazione per terapie personalizzate.

Pertanto, il laboratorio di patologia molecolare diagnostica è da considerarsi parte integrante della struttura e dell'attività di una moderna anatomia patologica.

L'allestimento e il corretto funzionamento di un laboratorio di diagnostica molecolare nell'ambito di una anatomia patologica non è cosa banale, richiedendo ampi spazi dedicati, strumentazione al passo con le innovazioni tecnologiche, personale con competenze specifiche in ambito medico, biologico e tecnico.

Il flusso di lavoro prevede una serie di aspetti che devono essere affrontati con particolare attenzione per arrivare ad un risultato ottimale: 1) *la fase preanalitica* che deve essere concepita sin dall'inizio in funzione delle attività diagnostiche sia morfologiche e immunoistochimiche che molecolari ricorrendo per queste ultime, se necessario, a percorsi dedicati; 2) *la fase analitica* che deve prevedere l'utilizzo delle più innovative ed adeguate tecnologie per la diagnostica degli specifici marcatori; 3) *I controlli di qualità*, sia esterni, condotti da enti riconosciuti a livello nazionale e/o internazionale, sia interni al laboratorio con lo scopo di mantenere nel tempo i livelli di qualità riconosciuti dai controlli esterni; 4) la stesura di un *referto diagnostico* secondo criteri di refertazione internazionali e modelli di refertazione concepiti per armonizzare il processo e fornire risultati più facilmente interpretabili ed applicabili nella pratica clinica.

E' chiaro che allo stato attuale, non tutte le anatomie patologiche sul territorio possono avere le strutture, il personale e le competenze per implementare un laboratorio di patologia molecolare nel quale effettuare qualsiasi tipo di analisi al momento richiesta. Né si intravede la necessità in un futuro di incrementare oltremodo i laboratori di patologia molecolare diagnostica, considerando i costi che lieviterebbero e la necessità di tenere elevato il livello qualitativo degli esami. Si ritiene piuttosto che possa essere utile una operazione di *centralizzazione gestita a livello regionale* per ottimizzare queste attività sul territorio.

Infine è opportuno costituire una *rete nazionale* dei centri che operano nel settore della patologia molecolare diagnostica all'interno delle anatomie patologiche o in stretta collaborazione con esse e rapportare le attività della rete a quanto si sta sviluppando a livello europeo.

Queste raccomandazioni, elaborate da una serie di esperti nell'ambito del gruppo PMMP, articolate secondo i punti precedentemente riportati, si propongono di favorire un armonico sviluppo sul territorio delle attività diagnostico-molecolari in anatomia patologica.

Organizzazione strutturale di un laboratorio di patologia molecolare

Il laboratorio di diagnostica molecolare è parte integrante della comunità biomedica a cui afferisce. Ha dei "fornitori", le sorgenti da cui provengono i materiali da analizzare, p. es. i materiali in corso di esame o degli archivi diagnostici, e dei "clienti", i medici impegnati nel trattare i pazienti che necessitano dei risultati del test, spesso oncologi. Pertanto il laboratorio deve essere connesso fisicamente (cioè situato in prossimità dell'archivio e del laboratorio di taglio e colorazione in un'unità di anatomia patologica) o collegato mediante specifici canali di trasporto con la sorgente del materiale da analizzare. Deve anche essere collegato per la trasmissione del

referto o per la discussione dei casi, con i medici che hanno richiesto il test, possibilmente mediante un sistema informatico integrato (Laboratory information system, LIS).

Il laboratorio richiede le attività di:

- Personale medico, che nel caso dell'anatomia patologica effettua la diagnosi, seleziona il campione da analizzare e controlla l'adeguatezza qualitativa/quantitativa del tessuto lesionale
- Biologi/biotecnologi che effettuano l'analisi molecolare
- Personale tecnico sanitario, che nel caso dell'anatomia patologica provvede al taglio del materiale dai blocchetti di paraffina e alla colorazione delle sezioni di controllo.

Tali attività devono essere svolte in spazi adiacenti o comunque connessi in maniera adeguata.

È essenziale che ogni laboratorio di diagnostica molecolare abbia a disposizione uno spazio dedicato, di dimensioni sufficienti. Lo spazio varia a seconda del volume delle prestazioni e della loro complessità, ma dovrebbe idealmente prevedere almeno 450 m². Gli strumenti e i reagenti usati più frequentemente dovrebbero trovarsi entro un raggio di pochi metri da ogni postazione di lavoro.

La distribuzione degli ambienti all'interno del laboratorio deve separare i vari passi del percorso analitico per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione.

I laboratori dedicati all'analisi degli acidi nucleici prevedono l'amplificazione di frammenti di DNA mediante PCR e la natura esponenziale delle reazioni di amplificazione del DNA pone seri rischi di contaminazione le cui conseguenze possono essere gravi.

Pertanto, la distribuzione degli ambienti nel laboratorio deve tenere conto di quattro attività distinte:

1. Preparazione dei reagenti e loro conservazione
2. Preparazione dei campioni e estrazione degli acidi nucleici
3. Amplificazione mediante PCR
4. Analisi dei prodotti di amplificazione.

Le fasi 1 e 2 sono "Pre-PCR", le fasi 3 e 4 sono "Post-PCR".

Una separazione dei percorsi e/o degli ambienti durante lo svolgimento di queste attività è essenziale per ridurre al minimo il rischio di due tipi di contaminazione:

A. Cross-contaminazione, cioè contaminazione da DNA genomico ("Target template contamination"), associata alle fasi Pre-PCR, spesso dovuta alla presenza di microparticelle di tessuto o di microgoccioline di acidi nucleici, con rischio particolarmente elevato nel caso di analisi ripetute dello stesso tipo di campione.

B. Contaminazione da riporto ("Carryover contamination"), cioè contaminazione da prodotti di DNA amplificato, associata alle fasi Post-PCR, dovuta alla aerosolizzazione degli ampliconi, la più rischiosa in quanto gli ampliconi non possono essere identificati prima che si verifichi la contaminazione, il rischio è legato alla frequenza con cui un dato amplicone viene prodotto e alla sua concentrazione.

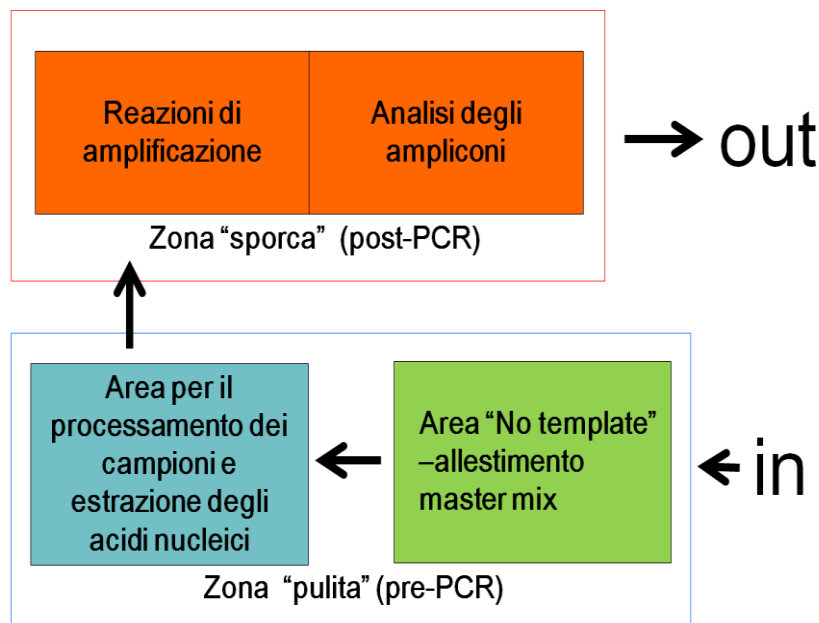
Sono dunque da prevedere aree separate per attività Pre-PCR e Post-PCR, con strumenti e consumabili (pipette, puntali, piastre, provette etc.) dedicati per i seguenti spazi (Schema 1):

- Area "No template" (Pre-PCR) che deve rimanere sempre libera da acidi nucleici e ampliconi dedicata alla preparazione e stoccaggio dei reagenti. Se possibile questa area dovrebbe avere una ventilazione a pressione leggermente positiva, per prevenire contaminazione da materiale e acidi nucleici estranei ambientali.

- Aree destinate al trattamento pre-analitico dei campioni (Pre-PCR), dove il materiale da analizzare viene processato, gli acidi nucleici estratti e conservati, e dove - se necessario - viene prodotto cDNA. Queste aree consistono di spazi distinti per: i) dissezione del materiale biologico, paraffinato o meno; ii) estrazione degli acidi nucleici; iii) allestimento delle reazioni con aggiunta degli acidi nucleici alle mastermix per amplificazione del DNA e preparazione alle analisi di sequenza.
- Aree Post-PCR, con separazione della zona dedicata alle reazioni di amplificazione con quella dedicata all'analisi degli ampliconi. Nella prima zona si trovano strumenti quali dispositivi per elettroforesi, termociclatori; nella seconda, piattaforme di sequenziamento, di real-time PCR o per expression profiling. È preferibile avere almeno una stanza dedicata per gli strumenti: la stanza dev'essere ben areata o a temperatura controllata, gli strumenti non troppo ravvicinati (per evitare il surriscaldamento) e collegati a un gruppo elettrico di continuità. Se possibile queste aree dovrebbero avere una ventilazione a pressione leggermente negativa, per prevenire la disseminazione ambientale di ampliconi aerosolizzati. È comunque essenziale che nessun oggetto o reagente passi dalle aree Post- a quelle Pre-PCR.

Schema 1

Corretto workflow del laboratorio



Se lo spazio a disposizione del laboratorio è limitato e tutte le attività devono essere svolte in un unico ambiente (situazione non raccomandabile) aumenta notevolmente la complessità del percorso in quanto si rende necessaria una separazione "temporale" tra le attività Pre- e Post-PCR. Le prime possono essere svolte la mattina, le seconde il pomeriggio. In questo caso è essenziale l'utilizzo di cappe a flusso laminare attrezzate con lampade a raggi UV per le attività Pre-PCR. Al termine delle operazioni gli spazi interni della cappa vanno puliti con una soluzione di NaClO al 10% e le lampade UV accese per denaturare gli acidi nucleici.

I recenti sviluppi tecnici inclusi metodi di sequenziamento di nuova generazione sfruttano principi di microfluidica e microfabbricazione nelle varie componenti del percorso analitico, riducendo di molto i rischi di contaminazione da riporto ("Carryover contamination"). Ciononostante la separazione delle attività Pre- e Post-PCR è un obiettivo da perseguire in ogni laboratorio di diagnostica molecolare.

La fase pre-analitica

La fase pre-analitica ha inizio con la richiesta dell'esame molecolare. Solitamente la richiesta parte dall'oncologo che intende trattare il paziente oncologico con una terapia farmacologica mirata; tuttavia, la richiesta può anche essere condivisa in maniera multidisciplinare (tumour board) o può partire dallo stesso patologo, che avvia la procedura dell'esame molecolare ("reflex testing") al momento della diagnosi di patologie neoplastiche in fase avanzata di malattia quando esistono le condizioni per una richiesta da parte del medico curante all'atto della ricezione della diagnosi (ad esempio carcinomi del colon o del polmone). Questa modalità abbrevia i tempi diagnostici e riduce i costi collegati all'attivazione della procedura in tempi differiti. Una buona comunicazione tra gli oncologi, i patologi ed il laboratorio molecolare è, comunque, cruciale per ottenere esami appropriati in tempi rapidi. Ciò è ancora più valido nel caso di piccole biopsie o di campioni citologici, soprattutto quando vi è necessità di svolgere più determinazioni per più geni o trascritti genici clinicamente rilevanti. La richiesta dell'esame molecolare deve riportare in maniera completa le informazioni cliniche pertinenti, il referto patologico e, soprattutto nel caso di ri-biopsie, l'indicazione di precedenti trattamenti chemioterapici.

Nella fase successiva si stabilisce l'adeguatezza del campione per l'analisi molecolare. In particolare è precipuo compito del patologo stabilire il contenuto tumorale. Il patologo da solo, o supervisionando un tecnico esperto, effettua la microdissezione (arricchimento della componente tumorale). Questa fase evita sia falsi-negativi, che problemi di inibizione di amplificazione del DNA (dovuti ad esempio alla presenza di mucina, melanina o altri inibitori). La percentuale di cellule neoplastiche recuperata per l'analisi deve essere conforme alla sensibilità della tecnica adoperata. È da notare come la valutazione microscopica della percentuale di cellule neoplastiche sia relativamente riproducibile; di conseguenza, le tecnologie più sensibili (come quelle basate su real time PCR, spettrometria di massa, sequenziamento di nuova generazione), devono essere impiegate qualora la percentuale di cellule neoplastiche sia dubbia o limitata.

Per i campioni istologici la microdissezione dell'area neoplastica è da effettuarsi con l'ausilio di strumenti monouso (bisturi o aghi) utilizzando come guida la sezione in ematossilina ed eosina adoperata per la valutazione della cellularità neoplastica. Per i campioni citologici, che giungono allestiti nel laboratorio di Patologia Molecolare, una delle fasi critiche è rappresentata dalla rimozione del vetrino coprioggetto. A tal proposito, si consiglia di riportare con una smerigliatrice sul retro del vetrino l'area selezionata, prima di immergere il campione in una soluzione di xilolo. Questa fase, specifica per i campioni citologici, ha un tempo medio di 2 giorni.

L'estrazione degli acidi nucleici rappresenta il momento conclusivo della fase pre – analitica; le procedure basate sull'uso di solventi chimici quali fenolo e cloroformio tradizionalmente utilizzate nei laboratori di ricerca mal si adattano ai campioni della routine diagnostica anatomo-patologica. In alternativa, numerosi sistemi commerciali, basati su colonnine a setto poroso per esclusione o a separazione magnetica su biglie metalliche, consentono di recuperare acidi nucleici di qualità adeguata alle indagini molecolari; la possibilità di automatizzare il processo di estrazione consente in laboratori ad alta processività di standardizzare la procedura e minimizzare il rischio di contaminazioni.

La valutazione della quantità del DNA purificato può essere eseguita con l'ausilio di varie tecnologie; quelle basate sulla valutazione dell'assorbanza, permettono una valutazione globale del contenuto in nucleotidi della sospensione in esame nonché della presenza di contaminati chimici, mentre le metodiche fluorimetriche consentono la valutazione della quantità del DNA a doppio filamento adeguata per le reazioni di amplificazione.

La fase analitica

La scelta del metodo analitico deriva dalle esigenze di giungere ad una definizione diagnostica o dalla disponibilità di farmaci diretti contro specifiche varianti mutazionali o alterazioni molecolari definite in termini anglosassoni "actionable mutations".

Altri fattori importanti per la scelta del metodo analitico sono:

- **Analisi mirate o estese.** Sono preferibili i test di screening che evidenziano solo gli esoni o i loci sede di mutazioni rilevanti per la sensibilità o la resistenza alle terapie rispetto ai metodi che analizzano tutti gli esoni.
- **Saggi predeterminati o indeterminati:** I saggi predeterminati riconoscono a priori solo le mutazioni più frequenti (come ad esempio i kit basati su real time PCR, pirosequenziamento o spettrometria di massa). I metodi di sequenziamento indeterminato (sequenziamento diretto o sequenziamento NGS) sono in grado di identificare tutte le possibili varianti, anche le più rare. Entrambe le strategie hanno pro e contro, la scelta dipende dal laboratorio e dalle applicazioni cliniche cui i saggi sono destinati. I saggi predeterminati sono in genere kit certificati per diagnostica in vitro e più costosi. I test indeterminati sono di solito basati su metodi sviluppati nei singoli laboratori e meno costosi, anche se esistono già kit certificati per diagnostica in vitro. I pannelli utilizzati dalle piattaforme di NGS hanno il miglior rapporto costo/efficienza ma richiedono strumenti e personale dedicato e la certificabilità dell'interpretazione dei dati bioinformatici è agli inizi. Il sequenziamento diretto secondo Sanger, resta ancora il gold standard metodologico per la conferma di varianti rare o mutazioni complesse.
- **Sensibilità:** La sensibilità dei metodi è crescente a partire dal sequenziamento diretto (20-30%), pirosequenziamento, spettrometria di massa, fino all'1-5% del sequenziamento NGS e della real time PCR. La scelta dipende dall'arricchimento in cellule neoplastiche del campione. Poiché i

test più sensibili sono anche i più costosi sarebbe ottimale avere a disposizione in ogni laboratorio un metodo sensibile per i campioni poco arricchiti (biopsie, citologia) e uno meno sensibile per quelli più arricchiti (pezzi chirurgici). Sul DNA estratto da tessuti o campioni citologici, non è consigliabile utilizzare metodi con sensibilità inferiore all'1%. L'esame delle biopsie liquide, recentemente introdotte in diagnostica, richiede strumentazioni dedicate molto più sensibili (si rimanda ad un documento specifico in preparazione).

- **Marcatura CE-IVD:** La norma ISO15189 richiede che i test diagnostici sviluppati internamente nei laboratori siano rigorosamente validati con altri test coperti dalla marcatura CE-IVD. In linea di principio i test marcati CE-IVD sono da preferire nei laboratori diagnostici. Tuttavia, sulla certificazione CE-IVD di strumenti e kit singoli o assemblati di biologia molecolare la legislazione Italiana non è chiara. Per contro, l'utilizzo di reagenti di rilevazione diversi non IVD, utilizzati nei metodi sviluppati in laboratorio, richiede obbligatoriamente che ciascun nuovo lotto venga validato internamente e l'intera procedura sia sottoposta a controllo di qualità esterno.
- **Variabilità analitica.** Come tutti i test di laboratorio anche quelli mutazionali e ISH richiedono standard di accuratezza e precisione basati sui risultati attesi per quel determinato test e campione. I kit commerciali includono sempre parametri di riferimento (controlli interni) all'interno dei quali il test è considerato affidabile. I test sviluppati internamente nei laboratori devono comprendere allo stesso modo controlli interni positivi e negativi e le sedute ripetute in duplicato.
- **Tempo di esecuzione (TAT).** Per motivi etici non è accettabile che un singolo test diagnostico predittivo per la risposta a un farmaco oncologico venga refertato in >10 giorni lavorativi, l'obiettivo dovrebbe essere l'erogazione entro 5 giorni. La maggior parte dei kit commerciali e anche dei metodi sviluppati internamente nei laboratori consente tempi di refertazione <5 giorni lavorativi per singoli test. Tempi più lunghi sono ammissibili solo in caso di validazioni di risultati equivoci o per l'esecuzione di pannelli mutazionali NGS ad ampio spettro. In ambiti specifici la scelta di un metodo con TAT più rapido dipende dal contesto del laboratorio come per esempio nel caso della scelta tra una FISH manuale (3 giorni di lavorazione ma meno costosa in termini di reagenti) e una DDISH automatizzata (1 giorno per ottenere il risultato, ma più costosa).

Indipendentemente dal metodo certificato IVD o meno e dalle strumentazioni disponibili è obbligatorio per l'operatività dei laboratori di patologia molecolare diagnostica partecipare a controlli di qualità esterni riconosciuti e specifici per i diversi marcatori analizzati (per questo argomento si rimanda ad altre raccomandazioni). Una volta superato il controllo di qualità esterno per un determinato marcatore, il laboratorio ha l'obbligo di mettere in atto una serie di procedure per mantenere nel tempo un costante livello di qualità.

I Controlli di Qualità Interni

Tutti i Servizi di Anatomia Patologica e in particolare i Laboratori di Diagnostica Molecolare dovranno ottenere nel prossimo futuro una Certificazione secondo la norma ISO 15189, definita a livello Europeo, che certifica i processi di laboratorio ed integra la ISO9001, ottenuta da gran parte dei Servizi. In vari Paesi del Nord Europa tale norma è fatta propria da gran parte dei Laboratori in cui si effettua diagnostica clinica. Essa sta inoltre diventando requisito essenziale per quei centri che ambiscono a svolgere il ruolo di diagnostica centralizzata per trials clinici sponsorizzati da industrie farmaceutiche oppure accademici multicentrici.

Il percorso è complesso in quanto non si limita al controllo del processo, ma è orientato all'outcome, al risultato delle indagini svolte, al loro impatto clinico e, in ultima analisi alla "soddisfazione del cliente", sia esso il paziente, il clinico che invia l'esame, l'ente esterno con cui si è convenzionati o la stessa Istituzione in cui si opera attraverso vari attori (pazienti, medici, amministrazione), definiti stakeholders.

La qualità del nostro prodotto è frutto della sinergia tra Good Clinical Practice (in questo caso rappresentata dalla appropriatezza della richiesta e dalla rappresentatività dei campioni) e la qualità della nostra attività (Good Laboratory Practice). Tale sinergia si definisce Good Clinical and Laboratory Practice.

I parametri attraverso i quali essa si attua sono i seguenti:

a) L'idoneità degli spazi e degli impianti

b) La corretta gestione dei flussi di lavoro. Si noti che la qualità dei campioni biotici che giungono in Anatomia Patologica, la tempestività e la qualità della fissazione e della processazione, il tempo che impiegano per giungere al Laboratorio di Biologia Molecolare sono parametri fondamentali per il controllo del processo. E' quindi chiaro che qualsiasi Certificazione di un Laboratorio di Biologia Molecolare operante in una Anatomia Patologica non può prescindere dal controllo del processo dell'Anatomia Patologica stessa.

c) La formazione del personale. Tale processo deve essere allargato a tutti gli operatori in senso globale, prescindendo dalle qualifiche. Tutti partecipano al processo e portano un contributo a prescindere dalla loro figura professionale. La dinamica tra Patologo e Biologo Molecolare è essenziale; lo sforzo di formazione è reciproco e deve tendere a individuare un comune terreno di operatività attraverso un linguaggio condiviso; nello stesso modo la responsabilità è condivisa nel rispetto delle competenze. La formazione è responsabilità specifica del Direttore. La domanda chiave che si deve porre è se nel suo gruppo di lavoro esistono professionalità idonee al compito o se è più opportuno ricercarle al di fuori

Una volta definito il gruppo si condividono e si scrivono le Procedure Operative Standard (SOPs).

d) Le SOPs sono documenti che descrivono le attività ricorrenti del Laboratorio e che sono rilevanti all'ottenimento della qualità dei referti erogati. Il proposito è quello di svolgere il lavoro correttamente e sempre nello stesso modo. Esse devono essere periodicamente aggiornate in

funzione delle scelte operative effettuate e consultate. Il rispetto delle SOPs è obbligatorio. Le modifiche sono possibili, ma le ragioni che le hanno causate devono essere riportate. Le SOPs sono importanti anche per facilitare l'inserimento di nuove figure professionali. Devono essere fornite le informazioni che riguardano la "Lab Biosafety" comprendendo l'equipaggiamento di protezione, le istruzioni per l'uso di prodotti chimici; devono essere conosciuti i test eseguibili nel Laboratorio, il flusso di lavoro e i processi che lo caratterizzano, le norme riguardanti la manutenzione ordinaria e straordinaria degli strumenti. Il nuovo personale deve leggere, comprendere e sottoscrivere le SOPs. Successivamente la persona dovrà essere affidata a un tutor e con lui eseguirà dei test; quindi eseguirà da solo tests su campioni precedentemente testati.

e) Valutazione delle performances del personale (tecnici, biologi, patologi).

Devono essere adottati meccanismi di controllo sulla attività. Ad esempio possono essere registrate nel corso del tempo le percentuali delle PCR non andate a buon fine, dei problemi di sequenziamento, delle contaminazioni. Il decremento progressivo delle percentuali corrisponde al miglioramento delle performances d'equipe. Il personale può essere suddiviso in due gruppi (ciascuno costituito da un tecnico, un biologo molecolare e un patologo); vengono scelti due campioni di tumore, uno mutato , l'altro no. Si distribuiscono 5 sezioni successive della stessa lesione ai due gruppi; viene richiesto di valutare l'adeguatezza del campione, la percentuale di cellule tumorali presenti, la qualità dell'estrazione di DNA in termini quantitativi e qualitativi, il risultato dell'analisi. I risultati vengono poi discussi collegialmente e riportati in un apposito file.

f) La scelta strumentale

La scelta degli strumenti non è parametro standardizzabile. Essa dipende dalle risorse disponibili, dal numero di test richiesti in un anno, dal menu test erogato dal Laboratorio, dal livello di formazione del personale. Ma in ogni caso la scelta si esegue secondo criteri competitivi come ad esempio con l'esame dei risultati ottenuti da un assay in programmi di controlli di qualità esterni, la facilità d'uso dello strumento e l'immediatezza della valutazione dei controlli positivi e negativi, i costi di manutenzione, la produttività (troughput) della piattaforma. Da non sottovalutare è la "robustezza" delle metodiche; questa è definibile come la possibilità di ottenere lo stesso risultato quando lo strumento è usato da personale diverso, ad ore diverse, in condizioni di temperatura e di umidità diverse, sugli stessi campioni. Devono essere considerati i costi (diretti e indiretti) sostenuti per singolo test e i costi dei controlli positivi e negativi.

g) Valutazione della sensibilità delle metodiche

Considerati i problemi di eterogeneità è di fondamentale importanza che ogni laboratorio definisca la sua sensibilità analitica con dei reference standards di DNA. Per sensibilità analitica si deve intendere la più bassa concentrazione di cellule tumorali in cui è possibile identificare una mutazione target con il 100% di precisione nei replicati.

Considerato il problema della eterozigosi, la minima componente neoplastica presente nella sezione dovrebbe essere quantitativamente doppia rispetto al limite di rilevazione strumentale.

Per esempio un campione con il 10% di cellule tumorali dovrebbe essere testato con un assay con limite di rilevazione di almeno il 5%.

h) Validazione delle metodiche

Il numero di test da eseguire per validare una metodica, varia in funzione del numero dei casi studiati; il numero è infatti proporzionale al potere statistico nella analisi di validazione (Mattocks CJ et al. Eur J Hum Genet 2010).

Il College of American Pathologists ha riportato che 40 casi sono sufficienti per la validazione di un assay anche non commerciale ; il potere statistico generato da 40 casi corrisponde ad una sensibilità attesa del 92.5% (Kamel-Reid S et al. Arch Pathol Lab Med 2012;136:26–32.). Per raggiungere una sensibilità attesa del 99% occorrerebbe testare 300 casi.

Conclusione

Le nostre metodiche di indagine forniscono risultati qualitativi. Pertanto non possiamo eseguire controlli di qualità di tipo statistico. Devono essere attivati sistemi di controllo interno basati su principi ed interventi di controllo di processo prefissati per ottenere un risultato analitico adeguato. Possono essere più facilmente o più frequentemente controllate in una verifica di processo le temperature, i volumi (dispensatori), la qualità e la stabilità dei reagenti. Un controllo di qualità interno non può prescindere dal successo della condivisione delle procedure e delle scelte strumentali nel contesto di un processo di formazione continua e globale volta non solo al controllo del processo ma del risultato.

La refertazione

La refertazione, parte integrante della procedura diagnostica, è il risultato di un processo multifasico che converte il risultato di un'analisi strumentale in un'informazione di utilità clinica, ovvero necessaria per un'adeguata impostazione terapeutica.

Il referto deve essere compilato su un modello prestabilito, firmato dall'anatomo-patologo e dall'esecutore del test molecolare e preferibilmente strutturato in tre campi principali:

1. Identificazione del paziente e notizie anamnestiche.

In questa sezione devono essere riportate le informazioni relative a:

- dati anagrafici del paziente;
- medico e/o struttura che ha richiesto l'analisi;
- tipologia del materiale utilizzato (es. inclusione in paraffina, sezione di tessuto, prelievo citologico, plasma), con riferimento alla diagnosi cito-istologica.

- Notizie anamnestiche essenziali. (es. per patologie neoplastiche polmonari, indicare l'abitudine al fumo).

2. Risultato del test molecolare.

In base alla tipologia di analisi richiesta, analisi predittive mutazionali o in situ, le informazioni da riportare nel referto sono:

a) analisi predittive mutazionali:

- i risultati del test espressi in termini di assenza o presenza di mutazione; in quest'ultimo caso descrivere la mutazione sia a livello di Dna che di proteina secondo la nomenclatura internazionale; in caso di campione non idoneo per l'analisi riportare il motivo dell'inadeguatezza.
- la percentuale di cellule neoplastiche relativa all'area del campione biologico selezionata per l'analisi;
- la metodica ed il test commerciale impiegati per l'esecuzione dell'analisi e la sensibilità analitica del metodo;
- gli esoni sottoposti ad analisi o le mutazioni indagate in caso di metodiche a bersaglio molecolare;

b) analisi predittive in situ:

- i risultati del test FISH devono essere espressi in termini di assenza o presenza di alterazioni genomiche (es. amplificazione del gene HER2 o riarrangiamento del gene ALK-1). In considerazione del fatto che i criteri per la definizione di positività differiscono a seconda del marcatore e della tipologia di tumore, si raccomanda di seguire gli standard minimi stabiliti dalle società scientifiche AIOM-SIAPEC e dalle linee guida ASCO-CAP
- Per l'analisi immunoistochimica il risultato, a seconda del marcatore e dell'anticorpo utilizzato, deve essere espresso mediante una valutazione binaria (positivo/negativo) o mediante un opportuno score system con la possibile aggiunta della percentuale di cellule positive, della localizzazione dell'immunoreattività (di membrana, citoplasmatica o nucleare) e dell'intensità della colorazione. Anche per questa tipologia di analisi si raccomanda di seguire gli standard minimi stabiliti dalle società scientifiche per gli specifici marcatori;
- La percentuale di cellule neoplastiche nel campione biologico in esame;
- la procedura impiegata per l'esecuzione dell'analisi, ibridazione in situ a fluorescenza (FISH) e/o immunoistochimica (ICH), con particolare riferimento per la FISH al tipo di sonda e alla ditta produttrice, per l'ICH al clone anticorpale, all'eventuale sistema di amplificazione, alla ditta produttrice ed al sistema di rivelazione adottato;
- in caso di materiale non idoneo per l'analisi riportare il motivo dell'inadeguatezza.

c) analisi predittive su marcatori multipli:

nel caso l'analisi sia stata eseguita con kit che analizzano geni multipli con qualsivoglia metodica, è necessario che il paziente sia adeguatamente informato e firmi il proprio consenso all'analisi di geni che non siano stati espressamente richiesti dal clinico.

3. Interpretazione clinica e tempistica.

Il risultato dell'analisi molecolare deve essere contestualizzato in relazione alla risposta al trattamento farmacologico sulla base dei dati disponibili in letteratura.

In considerazione dell'impatto sulla strategia terapeutica, il tempo per la refertazione non deve superare le due settimane dalla richiesta della determinazione.

La centralizzazione dei laboratori

Numerosi studi scientifici in campo medico e chirurgico hanno dimostrato che solo centri ad "alto volume" sono in grado di fornire risultati con alti standard qualitativi e con tempistiche ridotte. I processi di centralizzazione di attività mediche e chirurgiche complesse sono infatti già una realtà in diversi paesi europei. La diagnostica molecolare non è una eccezione, ma è invece un campo che più di altri è oggetto di continua e rapida evoluzione.

Recenti studi di settore indicano che il numero e la tipologia di test molecolari diagnostici da implementare aumenterà in maniera esponenziale nel corso dei prossimi anni, soprattutto in risposta allo sviluppo di numerosi nuovi farmaci a bersaglio molecolare. Inoltre, la terapia molecolare basata su un unico bersaglio molecolare ha un successo variabile e lo sviluppo di resistenza è la regola, e questo fa vacillare la odierna corrispondenza un marcatore – un farmaco, spingendo verso l'implementazione di una diagnostica molecolare basata su analisi di marcatori multipli con tecnologie anche diversificate.

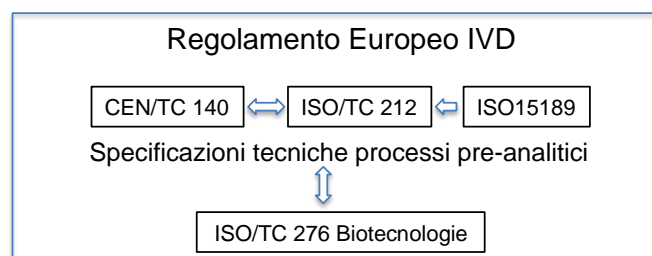
La centralizzazione dei laboratori appare l'unica soluzione perseguibile per rispondere alle esigenze di garantire la sostenibilità economica, strumentale e culturale (risorsa umana) di una diagnostica molecolare integrata perseguendo gli obiettivi di:

1. Raggiungere la più alta efficienza contenendo i costi.
2. Razionalizzare l'utilizzo delle risorse umane e strumentali.
3. Assemblare un *team* numericamente adeguato e competenze diversificate di alto profilo.
4. Garantire l'innovazione con tempestività.

1. *Raggiungere la più alta efficienza contenendo i costi.* Un alto numero di esami permette l'accorpamento dei test da eseguire con un miglioramento dei tempi di risposta. Il contenimento dei costi è legato alla realizzazione di una economia di scala, in termini sia di riduzione dei costi unitari dei prodotti che di distribuzione dei costi fissi su una produzione più ampia.

2. *Razionalizzare l'utilizzo delle risorse umane e strumentali.* La diagnostica molecolare ha due ingredienti: il campione e la tecnologia impiegata. I due ingredienti non possono essere separati in quanto (i) il trattamento del campione varia al variare delle diverse finalità diagnostiche, e (ii) la tecnologia da applicare allo specifico obiettivo è funzione del tipo e qualità del campione a disposizione. Accorpare tutti i campioni di una stessa tipologia (citologici, biotici o chirurgici) che vanno trattati e analizzati con tecnologie diverse permette la razionalizzazione delle risorse umane e strumentali a disposizione.
3. *Assemblare un team numericamente adeguato e competenze diversificate di alto profilo.* Acquisire una tecnologia non equivale ad acquisire le conoscenze che consentono l'appropriato uso dei metodi e la appropriata interpretazione dei risultati. La diagnostica molecolare è per sua natura complessa e richiede consolidate competenze generali assieme a competenze molto specifiche nei diversi settori di applicazione. La centralizzazione permette di assemblare un team composto da personale con competenze specifiche e diversificate in ambito medico, biologico, e tecnico in stretto connubio. In particolare, l'introduzione del sequenziamento di ultima generazione richiede anche la presenza di figure con competenze bioinformatiche, il cui reclutamento sarebbe improponibile in un contesto di piccoli laboratori diffusi sul territorio.
4. *Garantire l'innovazione con tempestività.* Non si tratta solo di capacità di recepire l'innovazione tecnologica. Essendo un settore in continua evoluzione, è necessario affiancare la pratica clinica della diagnostica molecolare alla spinta innovativa e continua della ricerca, accelerando il processo di inserimento delle più recenti novità scientifico-culturali nella pratica clinica. Ad esempio, è prevedibile che la diagnostica molecolare veda l'introduzione di metodologie per l'analisi simultanea di diverse "pathway" coinvolte nei diversi tipi di tumore, in quanto è emegente il concetto che interazioni sia all'interno della stessa "pathway" che tra le diverse "pathway" coinvolte influenzano la sensibilità o resistenza della neoplasia al trattamento. La certificazione del laboratorio secondo le norme europee che permettano l'introduzione di nuovi test sulla base di un accreditamento in termini di qualità e competenza (ISO 15189) diventa indispensabile (vedi schema 2) ed è perseguibile solo da laboratori con adeguata massa critica.

Schema 2



CEN/TC 140: Standard definiti dalla commissione tecnica 140 per la diagnostica medica in vitro (Commissione Europea Standardizzazione).

ISO/TC 212: Standard definiti dalla commissione tecnica 212 (Organizzazione Internazionale Standardizzazione test di laboratorio clinico e sistemi diagnostici in vitro).

ISO 15189: Requisiti per l'accreditamento dei laboratori medici in termini di qualità e competenza.

ISO/TC 276: Standardizzazione dei processi biotecnologici.

Una rete Nazionale dei Centri Diagnostici di Riferimento sui modelli Europei

Il rapido sviluppo della diagnostica e ricerca clinica in campo molecolare necessita una maggiore organizzazione che si sta realizzando a livello europeo. A tal fine è necessario che le principali Società Scientifiche e le Organizzazioni Europee coinvolte nel settore patologico-molecolare interagiscano tra di loro e con infrastrutture europee collaterali, come ad esempio quella delle biobanche e risorse biologiche (Biobanking and Biomolecular Resources Reserch Infrastructure BBMRI-ERIC). Può risultare estremamente utile che questa interazione venga riprodotta anche su scala nazionale, soprattutto considerando l'importante posizione dell'Italia, in termini demografici, a livello europeo. A tal proposito, una iniziativa interessante è la costituzione della rete NIPAB (Network of Italian Pathology Archive Biobanks), associata a BBMRI-IT, che si pone come un consorzio di anatomia patologica e patologia molecolare rivolte anche alla ricerca clinica. L'iniziativa nasce su base collaborativa e volontaria. La partecipazione a queste iniziative può favorire collegamenti ad importanti progetti di ricerca clinica sui nuovi biomarcatori e target terapeutici in campo europeo. Oggi è infatti estremamente difficile accedere a un progetto europeo anche a causa della irriproducibilità dei risultati delle ricerche effettuate anche su media e larga scala. Si raccomanda pertanto di seguire le indicazioni delle infrastrutture europee, come quelle di BBMRI-IT, nella richiesta di fondi comunitari. Infatti, i grandi progetti su scala internazionale vengono oggi preparati da gruppi di ricerca di base, che lavorano con tecniche sofisticate in modelli animali, che devono collegarsi nello stesso progetto anche con gruppi esperti di ricerca traslazionale che permettano di giungere in tempi brevi a una validazione clinica. Ciò risulta molto più semplice ed efficace se i percorsi si realizzano sulla base dei modelli presentati dalle organizzazioni europee come BBMRI-ERIC e OECI (Organisation of European Cancer Institutes).

Partecipare a queste strutture, anche a livello nazionale, permette quindi ai vari anatomopatologi di accedere in prima persona alla più avanzata ricerca europea come collaboratori diretti per lo sviluppo di nuovi biomarcatori clinici. Ciò può permettere di interagire direttamente con il fronte più avanzato della ricerca clinica, con ovvi risvolti positivi, non solo per il progresso scientifico ed il prestigio della ricerca nazionale, ma anche per il trattamento dei pazienti. Si sta purtroppo creando un grande divario fra le diverse strutture sanitarie sul territorio, specialmente tra quelle che partecipano alle attività internazionali e quelle che non lo fanno. Questo divario ha portato addirittura la Commissione europea a stabilire comitati di esperti per uniformare su scala europea diagnostica e terapia ai più alti livelli, partendo dal cancro della mammella. È stato infatti organizzato un "Quality Assurance Scheme Group", composto da esperti internazionali, per dare regole diffuse e certe per questo tumore. In questo gruppo è stato anche creato un sottogruppo per la ricerca clinica poiché si prevede per i pazienti la possibilità di accedere, in casi particolari, a un secondo livello in cui analisi e terapie più avanzate possono essere eseguite.

Tutte queste considerazioni mostrano la rapida evoluzione in corso e le relative difficoltà che pongono l'assoluta necessità di partecipare a livello nazionale alle iniziative europee, come anche quella di organizzarsi per un'efficace ricerca clinica che, in base a quanto è già stato dimostrato, si collega direttamente a maggiori benefici per i pazienti.